

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

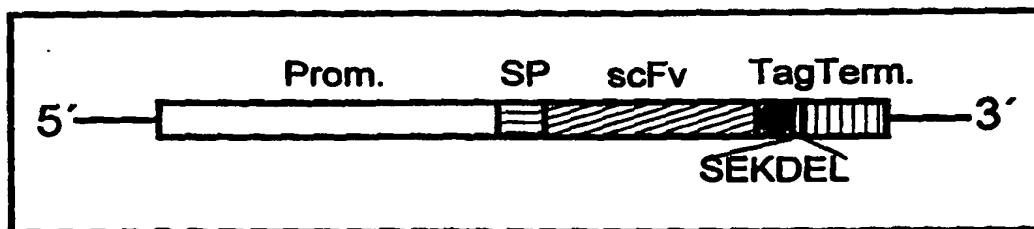


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> C12N 15/82, C07K 16/44, C12N 15/13, A01H 5/00, A01N 63/00		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 98/49329
			<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 5. November 1998 (05.11.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/02242		<b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 16. April 1998 (16.04.98)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 18 251.8      30. April 1997 (30.04.97)      DE		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).		<b>Veröffentlicht</b> Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
<b>(72) Erfinder; und</b>			
<b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> AMMERMAN, Eberhard [DE/DE]; Von-Gagern-Strasse 2, D-64646 Heppenheim (DE). BUTTERFIELD, Earle [US/DE]; Albert-Einstein-Weg 39, D-67117 Limburgerhof (DE). VLERCHL, Jens [DE/DE]; Im Steg 36, D-68526 Ladenburg (DE). LORENZ, Gisela [DE/DE]; Erlenweg 13, D-67434 Neustadt (DE). MÖLLER, Achim [DE/DE]; Im Zaunrücken 10, D-67269 Grünstadt (DE). RABE, Udo [DE/DE]; Wachenheimer Strasse 2, D-67125 Dannstadt-Schauernheim (DE). SCHMIDT, Ralf-Michael [DE/DE]; Am Schloßgarten 9 d, D-67489 Kirrweiler (DE). CONRAD, Udo [DE/DE]; Corrensstrasse 3, D-06466 Gatersleben (DE).			

**(54) Title:** EXPRESSION OF FUNGICIDE-BINDING POLYPEPTIDES IN PLANTS FOR PRODUCING FUNGICIDE TOLERANCE

**(54) Bezeichnung:** EXPRESSION VON FUNGIZID-BINDENDEN POLYPEPTIDEN IN PFLANZEN ZUR ERZEUGUNG VON FUNGIZIDTOLERANZ



☐ USP-Promoter

☒ CaMV 35 Terminator

☒ LeB4-Signalpeptid

☒ single chain Fv

☒ c-myc-Tag

**(57) Abstract**

The invention relates to a method for producing fungicide-tolerant plants by expressing a fungicide-binding antibody therein.

**(57) Zusammenfassung**

Verfahren zur Herstellung von Fungizid-toleranten Pflanzen durch Expression eines Fungizid-bindenden Antikörpers in den Pflanzen.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Expression von Fungizid-bindenden Polypeptiden in Pflanzen zur Erzeugung von Fungizidtoleranz

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von fungizidtoleranten Pflanzen durch Expression eines exogenen Fungizid-bindenden Polypeptides in Pflanzen oder Pflanzenteilen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der entsprechenden Nukleinsäuren codierend für ein Polypeptid, einen Antikörper oder Teilen eines Antikörpers mit Fungizid-bindenden Eigenschaften in transgenen Pflanzen und die auf diese Weise transformierte Pflanze selbst.

Es ist bekannt, daß mit Hilfe von gentechnischen Verfahren gezielt Fremdgene in das Genom einer Pflanze übertragen werden können. Dieser Prozeß wird als Transformation und die resultierenden Pflanzen werden als transgene Pflanzen bezeichnet. Transgene Pflanzen werden derzeit in unterschiedlichen biotechnologischen Bereichen eingesetzt. Beispiele sind insektenresistente Pflanzen (Vaek et al. Plant Cell 5 (1987), 159-169), virusresistente Pflanzen (Powell et al. Science 232 (1986), 738-743) und ozonresistente Pflanzen (Van Camp et al. BioTech. 12 (1994), 165-168). Beispiele für gentechnisch erzielte Qualitätssteigerungen sind: Erhöhung der Haltbarkeit von Früchten (Oeller et al. Science 254 (1991), 437-439), Erhöhung der Stärkeproduktion in Kartoffelknollen (Stark et al. Science 242 (1992), 419), Veränderung der Stärke- (Visser et al. Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289-296) und Lipidzusammensetzung (Voelker et al. Science 257 (1992), 72-74) und Produktion pflanzenfremder Polymere (Poirer et al. Science 256 (1992), 520-523).

Ein wichtiges Ziel der pflanzenmolekulargenetischen Arbeiten ist die Erzeugung von Herbizidtoleranz. Die Herbizidtoleranz ist gekennzeichnet durch eine in Art oder Höhe gesteigerte Verträglichkeit der Pflanze oder von Pflanzenteilen gegenüber dem applizierten Herbizid. Diese kann auf verschiedene Arten bewerkstelligt werden. Die bekannten Methoden sind die Nutzung eines Metabolismus wie z.B. des pat-Gens im Zusammenhang mit der Glufosinat-Resistenz (WO 8705629) oder eines gegenüber dem Herbizid resistenten Zielenzym wie im Falle der Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (WO 9204449), die resistent ist gegen Glyphosat, sowie die Verwendung eines Herbizids in Zell- und Gewebekultur zur Selektion toleranter Pflanzenzellen und daraus resultierender resistenter Pflanzen wie bei Acetyl CoA Carboxylase

Hemmstoffen beschrieben (US 5162602, US 5290696).

Antikörper sind Proteine als Bestandteil des Immunsystems. Allen Antikörpern gemeinsam ist ihre räumliche, globuläre Struktur, der Aufbau aus leichter und schwerer Kette sowie ihre prinzipielle Fähigkeit, Moleküle oder Teile einer Molekülstruktur mit hoher Spezifität binden zu können (Alberts et al., in: Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage 1990, VCH Verlag, ISBN 3-527-27983-0, 1198-1237). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden Antikörper für vielfältige Aufgaben genutzt. Man unterscheidet dabei die Anwendung der Antikörper im tierischen und menschlichen Organismen, die sie produzieren, die sogenannte in-situ Anwendungen und die ex-situ Anwendungen, d.h. die Nutzung der Antikörper nach Isolierung aus den produzierenden Zellen oder Organismen (Whitelam und Cockburn, TIPS Vol.1 , 8 (1996), 268-272).

Die Verwendung hybrider somatischer Zelllinien (Hybridomas) als Quelle für Antikörper gegen ganz bestimmte Antigene geht auf Arbeiten von Köhler und Milstein zurück (Nature 256 (1975) 495-97). Nach diesem Verfahren lassen sich sogenannte monoklonalen Antikörper herstellen, die eine einheitliche Struktur besitzen und durch Zellfusion erzeugt werden. Dabei werden Milzzellen einer immunisierten Maus mit Zellen eines Mausmyeloms fusioniert. So entstehen Hybridomazellen, die sich unbegrenzt vermehren. Gleichzeitig sezernieren die Zellen spezifische Antikörper gegen das Antigen, mit dem die Maus immunisiert worden war. Die Milzzellen liefern die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, während die Myelomzellen die unbegrenzte Wachstumsfähigkeit und die kontinuierliche Antikörpersekretion beisteuern. Da jede Hybridomazelle sich als Klon von einer einzigen B-Zelle ableitet, besitzen alle erzeugten Antikörpermoleküle dieselbe Struktur einschließlich der Antigenbindungsstelle. Diese Methode hat die Anwendung von Antikörpern stark gefördert, da jetzt Antikörper mit einer einzigen, bekannten Spezifität und einer homogenen Struktur unbegrenzt zur Verfügung stehen. Monoklonale Antikörper finden breite Anwendung in der Immundiagnostik und als Therapeutika.

Seit einigen Jahren gibt es die sogenannte Phagen-Display-Methode zur Herstellung von Antikörpern, bei der das Immunsystem und die verschiedenen Immunisierungen im Tier umgangen werden. Hierbei wird die Affinität und Spezifität des Antikörpers in vitro maßgeschneidert (Winter et al., Ann. Rev. Immunol. 12 (1994), 433-455; Hoogenboom TIBTech Vol 15 (1997), 62 -70). Gensegmente, die die kodierende Sequenz der variablen Region von Antikörpern enthält, d.h. die Antigen-Bindestelle, werden mit Genen für das Hüllprotein eines Bakteriophagen fusioniert. Dann infiziert man Bakte-

rien mit Phagen, die solche Fusionsgene enthalten. Die entstehenden Phagenpartikel besitzen nun Hüllen mit dem antikörperähnlichen Fusionsprotein, wobei die antikörperbindende Domäne nach außen zeigt. Aus einer solchen Phagen-Display-Bibliothek läßt sich nun der Phage isolieren, der das gewünschte Antikörperfragment enthält und spezifisch an ein bestimmtes Antigen bindet. Jeder so isolierte Phage erzeugt ein monoklonales, antigenbindendes Polypeptid, das einem monoklonalen Antikörper entspricht. Die Gene für die Antigenbindungsstelle, die für jeden Phagen einzigartig sind, kann man aus der Phagen-DNA isolieren und zur Konstruktion vollständiger Antikörpergene einsetzen.

Auf dem Gebiet des Pflanzenschutzes wurden Antikörper insbesondere als analytisches Mittel ex-situ zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Antigenen genutzt. Dies schließt den Nachweis von Pflanzeninhaltsstoffen, Herbiziden oder Fungiziden in Trinkwasser (Sharp et al. (1991) ACS Symp Ser., 446 (Pestic. Residues Food Saf.) 87-95), Bodenproben (WO 9423018) oder in Pflanzen oder Pflanzenteilen sowie die Nutzung von Antikörpern als Hilfsmittel zur Reinigung von gebundenen Molekülen ein.

Die Produktion von Immunglobulinen in Pflanzen wurde erstmals von Hiatt et al., Nature, 342 (1989), 76 - 78 beschrieben. Das Spektrum reicht von Ein-Ketten-Antikörpern bis zu multimeren sekretorischen Antikörpern (J. Ma und Mich Hein, 1996, Annuals New York Academy of Sciences, 72 - 81).

Neuere Versuche nutzen Antikörper in-situ zur Pathogenabwehr in Pflanzen, insbesondere von Viruserkrankungen durch Expression von spezifischen Antikörpern oder Teilen davon gerichtet gegen Virus-hüllproteine in Pflanzenzellen (Tavladoraki et al., Nature 366 (1993), 469-472; Voss et al., Mol. Breeding 1 (1995), 39-50).

Ein analoger Ansatz ist auch zur Abwehr der Infektion der Pflanze durch Nematoden genutzt worden (Rosso et al., Biochem Biophys Res Com, 220 (1996) 255-263). Für eine pharmazeutische Anwendung sind Beispiele bekannt, die die Antikörper-Expression in-situ in Pflanzen für eine orale Immunisierung nutzen (Ma et al., Science 268 (1995), 716-719; Mason und Arntzen, Tibtech Vol 13 (1996), 388-392). Von der Pflanze gebildete Antikörper werden dabei aus Pflanzen oder für den Verzehr geeigneten Pflanzenteilen über den Mund, Rachen oder Verdauungstrakt dem Körper zugeführt und verursachen einen wirksamen Immunschutz. Weiterhin wurde in Pflanzen bereits ein Ein-Ketten-Antikörper (single chain antibody) gegen das niedermolekulare Pflanzenhormon Abscisinsäure exprimiert und eine verringerte Pflanzenhormonverfügbarkeit aufgrund von Absci-

sinsäurebindung in der Pflanze beobachtet (Artsaenko et al., The Plant Journal (1995) 8(5), 745-750).

Die chemische Pilzbekämpfung in agrarwirtschaftlich bedeutenden  
5 Kulturen setzt den Einsatz von hochselektiven Fungiziden ohne  
phytotoxische Wirkung voraus. Die phytotoxische Wirkung von Fungiziden kann beispielsweise auf einer Hemmung des Pflanzenwachstums, verminderter Photosyntheseleistung und damit verbundener verminderter Ertragsleistung beruhen. In einigen Fällen ist  
10 es jedoch schwierig, Fungizide mit ausreichender Selektivität zu entwickeln, die in allen bedeutenden Pflanzengroßkulturen einsetzbar sind und in keiner Kultur eine Schädigung der Ertragspflanze verursachen. Die Einführung von Fungizid-resistenten oder -toleranten Kulturpflanzen kann zur Lösung dieses Problems beitragen und neue Verwendungsmöglichkeiten von Fungiziden in bisher  
15 nicht oder nur unter Ertragsminderung behandelbaren Kulturen erschließen.

Der Entwicklung von Fungizid-resistenten Kulturpflanzen durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits die phytotoxische Wirkung bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden,  
20 deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Einbringung einer Resistenz durch Kreuzung auf Pflanzen der selben  
25 Art beschränkt.  
30

Aus diesen Gründen ist der gentechnische Ansatz, ein für die Resistenz codierendes Gen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen.  
35

Die molekularbiologische Entwicklung von Herbizid-toleranten bzw. Herbizid-resistenten Kulturpflanzen setzt bisher voraus, daß der Wirkmechanismus des Herbizides in der Pflanze bekannt ist und daß  
40 Gene, die Resistenz gegen das Herbizid vermitteln gefunden werden können. Viele gegenwärtig kommerziell genutzte Herbizide wirken, indem sie ein Enzym einer essentiellen Aminosäure-, Lipid- oder Pigmentbiosynthese blockieren. Durch Veränderung der Gene dieser Enzyme dergestalt, daß das Herbizid nicht mehr gebunden werden  
45 kann und durch Einbringung dieser veränderten Gene in Kulturpflanzen läßt sich Herbizid-Toleranz erzeugen. Alternativ können zum Beispiel in der Natur analoge Enzyme beispielsweise in Mikro-

organismen gefunden werden, die eine natürliche Resistenz gegenüber dem Herbizid zeigen. Dieses Resistenz vermittelnde Gen wird aus einem derartigen Mikroorganismus isoliert, in geeignete Vektoren umkloniert und anschließend nach erfolgreicher Transformation in Herbizid-sensitiven Kulturpflanzen zur Expression gebracht (WO 96/38567).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung eines neuartigen allgemein einsetzbaren, gentechnologischen Verfahrens zur Erzeugung von Fungizid-toleranten transgenen Pflanzen.

Diese Aufgabe wurde überraschenderweise gelöst durch ein Verfahren der Expression eines exogenen Polypeptides, Antikörpers oder Teilen eines Antikörpers mit Fungizid-bindenden Eigenschaften in den Pflanzen.

Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Herstellung eines Fungizid-bindenden Antikörpers und die Klonierung des zugehörigen Gens bzw. Genfragmentes.

Es wird zunächst ein geeigneter Antikörper erzeugt, der das Fungizid bindet. Dies kann u.a. durch Immunisierung eines Wirbeltiers, meist Maus, Ratte, Hund, Pferd, Esel oder Ziege mit einem Antigen erfolgen. Das Antigen ist dabei eine fungizid wirksame Verbindung, die über eine funktionelle Gruppe an einen höhermolekularen Träger wie Rinderserumalbumin (BSA), Hühnereiweiß (Ovalbumin), keyhole limpet hemocyanin (KLH) oder andere Träger gekoppelt oder assoziiert vorliegt. Die Immunantwort wird nach mehrmaliger Antigenapplikation mit gängigen Methoden nachvollzogen und so ein geeignetes Antiserum isoliert. Dieser Ansatz liefert zunächst ein polyklonales Serum, das Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten enthält. Für den gezielten in-situ Gebrauch ist es notwendig, die für einen einzelnen spezifischen monoklonalen Antikörper codierende Gensequenz zu isolieren. Zu diesem Zweck stehen verschiedene Wege offen. Der erste Ansatz nutzt die Fusion von Antikörper-produzierenden Zellen mit Krebszellen zu einer ständig Antikörper produzierenden Hybridomazellkultur, die durch Vereinzelung der enthaltenen Klone letztlich zu einer homogenen, einen definierten monoklonalen Antikörper produzierenden Zelllinie führt.

Aus einer derartigen monoklonalen Zelllinie wird die cDNA für den Antikörper bzw. Teile des Antikörpers, den sog. Ein-Ketten-Antikörper (single chain antibody - scFv) isoliert. Diese cDNA-Sequenzen können dann in Expressionskassetten kloniert und zur funktionellen Expression in prokaryotischen und eukaryotischen

Organismen, einschließlich Pflanzen genutzt werden.

Es ist auch möglich über Phagen-Display-Banken Antikörper zu selektieren, die Fungizidmoleküle binden und katalytisch in ein  
5 Produkt mit nicht fungiziden Eigenschaften umsetzen. Methoden zur Herstellung katalytischer Antikörper sind in Janda et al., Science 275 (1997) 945-948, Chemical selection for catalysis in combinatorial Antibody libraries; Catalytic Antibodies, 1991, Ciba Foundation Symposium 159, Wiley- Interscience Publication  
10 beschrieben. Durch Klonierung des Gens dieses katalytischen Antikörpers und dessen Expression in einer Pflanze kann im Prinzip ebenfalls eine Fungizid-resistente Pflanze erzeugt werden.

15 Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Expressionskassetten, deren kodierende Sequenz für ein Fungizid-bindendes Polypeptid oder dessen funktionelles Äquivalent codiert, sowie deren Verwendung zur Herstellung einer Fungizid-toleranten Pflanze. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäße Expressions-  
20 kassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die eine DNA-Sequenz aus einer Hybridomazelle enthalten, die für ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften codiert und die somit dem Wirt Resistenz gegen bestimmte Fungizide verleihen.  
25

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressions-  
30 kassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für  
35 das Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften und/oder Transitpeptid operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funk-  
40 tion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Plasmamembran, in der Vakuole, in Plastiden, ins Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker  
45 wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak Mosaic Virus (Gallie et



al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693-8711).

Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von  
5 Fremdgene steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell  
21(1980) 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer  
10 Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202).

15 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Polypeptids in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol.Biol.22(1993), 361-366), ein  
20 durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/1919443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor sind der  
Literatur beschrieben und können u.a. verwendet werden.  
25

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen sich die phytotoxische Fungizidwirkung entfaltet. Insbesondere zu  
30 nennen sind Promotoren, die eine Blatt-spezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245).

35 Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnten Einketten-Antikörper stabil bis zu 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10(1995), 1090-1094). Da auch eine Expression in ausgesäten oder keimenden Samen möglich und im Sinne  
40 der vorliegenden Erfindung erwünscht sein kann, sind entsprechend Keimungs- und Samen-spezifische Promotoren ebenfalls erfindungsgemäß bevorzugte regulative Elemente. Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den USP- oder LEB4-Promotor, das  
45 LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau der Kassette ist in der Abbildung 1 am Beispiel eines Einketten-Antikörpers (scFv-Gen) schematisch

beispielhaft dargestellt.

Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Polypeptid-DNA und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Polypeptid-DNA insertierten für ein Chloroplasten-spezifisches Transitpeptid kodierenden DNA sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, Plastiden, die Vakuole, in die Plasmamembran, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER sowie der Zellwand (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792; Artsaenko et al., Plant J. 8 (1995) 745-750).

Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren kodierende Sequenz für ein Fungizid-bindendes Fusionsprotein kodiert, wobei Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind Chloroplasten-spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des Fungizid-bindenden Polypeptides in die Pflanzenchloroplasten vom Fungizid-bindenden Polypeptid-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid abgeleitet von plastidärer Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase).

Die zur Herstellung erfindungsgemäßer Expressionskassetten erforderliche Polypeptid-DNA oder -cDNA wird vorzugsweise mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Verfahren zur DNA-Amplifikation mittels PCR sind bekannt, beispielsweise aus Innis et al., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications,

Academic Press (1990). Zweckmäßigerweise können die PCR-erzeugten DNA-Fragmente durch Sequenzanalyse zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten überprüft werden.

5 Die insertierte Nucleotid-Sequenz codierend für ein Fungizid-bindendes Polypeptid kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nucleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nucleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

20 Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

35 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von besonderer Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg ist das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL (Schuoten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

15 Eine erfindungsgemäße Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Der Aufbau der Kassette ist in Abbildung 2 am Beispiel eines Einketten-Antikörpers (scFv-Gen) schematisch dargestellt. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

25 Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften codiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38 und aus S.B. Gelvin, Molecular Genetics of T-DNA Transfer from *Agrobacterium* to Plants, gleichfalls in Transgenic Plants, S. 49-78. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die erfindungsgemäße Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines Polypeptides mit Fungizid-bindenden Eigenschaften enthalten.

30  
35  
40  
45

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für ein Fungizid-bindendes Polypeptid codierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regula-  
5 onssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Inte-  
gration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in  
"Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC  
Press), Kap. 6/7, S.71-119 (1993) beschrieben.

- 10 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und  
Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskas-  
setten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermeh-  
rung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonie-  
rungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pA-  
15 CYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E.*  
*coli* als auch in Agrobakterien replizieren können, wie z.B.  
pBin19 (Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711).
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung  
einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation  
von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vor-  
zugsweise ist Ziel der Verwendung die Vermittlung von Resistenz  
gegen Fungizide mit phytotoxischer Wirkung.
- 25 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch  
in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze er-  
folgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie  
deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Ge-  
30 genstand der vorliegenden Erfindung.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird  
als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen  
Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus  
35 Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen  
Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-  
transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme,  
der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation,  
die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die  
40 Mikroinjektion und der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer. Die  
genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al.,  
Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, En-  
gineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu,  
Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu.Rev.Plant  
45 Physiol.Plant Molec.Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vor-  
zugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor  
kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu trans-

formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711).

5 Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den  
10 verschiedenen Busch-, Baum-, Nuß- und Weinspezies, wie beispielsweise Kaffee, Obstbäume wie Apfel, Birnen oder Kirschen, Nußbäume wie Walnuß oder Pecan und besonders wichtig in Reben verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

15

Funktionell äquivalente Sequenzen, die ein Fungizid-bindendes Polypeptid codieren, sind erfindungsgemäß solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nucleotidsequenz noch die gewünschten  
20 Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an die Codon-Usage einer Pflanze angepaßte, künstliche Nucleotid-Sequenzen.

25

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten das Fungizid-bindende Polypeptid codierenden Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen um-  
30 fassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nucleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nucleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann  
35 z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Toleranz gegenüber Fungiziden zur Vermeidung phytotoxischer Effekte an Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise  
45 durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter

Proteine, die Fungizid-bindende Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Codon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Codon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

- 10 Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein nicht-pflanzliches Fungizid-bindendes Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann  
15 z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf scFvs Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das  
20 Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften an den gewünschten Wirkort leitet.

- Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte, sowie Fusionsproteine aus einem  
25 Transitpeptid und einem Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften.

- Resistenz bzw. Toleranz bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegenüber Fungiziden mit phytotoxischer Wirkung. Sie umfaßt die partielle und, insbesondere, die vollständige Unempfindlichkeit gegenüber diesen Inhibitoren für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

- 35 Der phytotoxische Wirkort von Fungiziden ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des exogenen Fungizid-bindenden Polypeptides ausreichenden Schutz bieten kann. Es ist jedoch naheliegend, daß die phytotoxische Wirkung eines  
40 Fungizids nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze gewebespezifisch erfolgen kann.

- Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen Fungizid-bindenden Polypeptides von Vorteil. Andererseits kann aber  
45 auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit des transgen exprimierten Polypeptides mit Fungizid-bindenden Eigenschaften kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung auf Fungizid-haltigem Medium über abgestufte Konzentrationsreihen oder über Samenkeimungstests ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Fungizid-verträglichkeit einer Testpflanze in Gewächshausversuchen getestet werden.

10 Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Getreide, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Sa-  
15 lat und die verschiedenen Busch-, Baum-, Nuß- und Weinspecies wie beispielsweise Kaffee, Obstbäume wie Apfel, Birnen oder Kirschen, Nußbäume wie Walnuß oder Pecan und besonders wichtig die Rebe.

20 Die transgenen Pflanzen, Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile können mit einem Fungizid mit phytotoxischer Wirkung, das die pflanzlichen Enzyme inhibiert, behandelt werden, wodurch die nicht erfolgreich transformierten Pflanzen, -zellen, -gewebe oder Pflanzenteile absterben bzw. geschädigt werden. Beispiele für geeignete Wirkstoffe sind Strobilurine insbesondere  
25 Methyl methoxyimino- $\alpha$ -(o-tolyloxy)-o-tolylacetate ( BAS 490F ), sowie Metabolite und funktionelle Derivate dieser Verbindungen. Die in die erfindungsgemäßen Expressionskassetten insertierte, für ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften codierende DNA, kann somit auch als Selektionsmarker verwendet werden.  
30

Insbesondere bei Kulturpflanzen bietet die vorliegende Erfindung den Vorteil, daß nach Induktion einer selektiven Resistenz der Kulturpflanze gegenüber Fungiziden mit phytotoxischer Wirkung  
35 derartige Fungizide in diesen Kulturen auch mit höheren Aufwandsmengen zur Bekämpfung von Schadpilzen eingesetzt werden können, die sonst zu Pflanzenschäden führen würden. Als nicht-limitierende Beispiele für derartige Fungizide mit phytotoxischer Wirkung können Verbindungen aus den folgenden Gruppen genannt werden:  
40

- Schwefel, Dithiocarbamate und deren Derivate, wie Ferridimethyldithiocarbamat, Zinkdimethyldithiocarbamat, Zinkethylenbis-dithiocarbamat, Manganethylenbisdithiocarbamat, Mangan-Zink-  
45 ethylen-diamin-bis-dithiocarbamat, Tetramethylthiuramdisulfide, Ammoniak-Komplex von Zink-(N,N-ethylen-bis-dithiocarbamat), Ammoniak-Komplex von Zink-(N,N'-propylen-bis-dithiocarbamat),



Zink-(N,N'-propylenbis-dithiocarbamat), N,N'-Polypropylen-bis-(thiocarbamoyl)disulfid;

- Nitroderivate, wie Dinitro-(1-methylheptyl)-phenylcrotonat, 2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenyl-3,3-dimethylacrylat, 2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenyl-isopropylcarbonat, 5-Nitro-isophthalsäure-di-isopropylester;
- heterocyclische Substanzen, wie 2-Heptadecyl-2-imidazolin-acetat, 2,4-Dichlor-6-(o-chloranilino)-s-triazin, O,O-Diethyl-phthalimidophosphonothioat, 5-Amino-1-[bis-(dimethylamino)-phosphinyl]-3-phenyl-1,2,4-triazol, 2,3-Dicyano-1,4-dithioanthrachinon, 2-Thio-1,3-dithiolo[4,5-b]chinoxalin, 1-(Butylcarbamoyl)-2-benzimidazol-carbaminsäuremethylester, 2-Methoxycarbonylamino-benzimidazol, 2-(Furyl-(2))-benzimidazol, 2-(Thiazolyl-(4))-benzimidazol, N-(1,1,2,2-Tetrachlorethylthio)-tetrahydrophthalimid, N-Trichlormethylthio-tetrahydrophthalimid, N-Trichlormethylthio-phthalimid;
- N-Dichlorfluormethylthio-N',N'-dimethyl-N-phenyl-schwefelsäurediamid, 5-Ethoxy-3-trichlormethyl-1,2,3-thiadiazol, 2-Rhodanmethythiobenzthiazol, 1,4-Dichlor-2,5-dimethoxybenzol, 4-(2-Chlorphenylhydrazono)-3-methyl-5-isoxazon, Pyridin-2-thio-1-oxid, 8-Hydroxychinolin bzw. dessen Kupfersalz, 2,3-Dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin, 2,3-Dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin-4,4-dioxid, 2-Methyl-5,6-dihydro-4H-pyran-3-carbonsäure-anilid, 2-Methyl-furan-3-carbonsäureanilid, 2,5-Dimethyl-furan-3-carbonsäureanilid, 2,4,5-Trimethyl-furan-3-carbonsäureanilid, 2,5-Dimethyl-furan-3-carbonsäurecyclohexylamid, N-Cyclohexyl-N-methoxy-2,5-dimethyl-furan-3-carbonsäureamid, 2-Methyl-benzoesäure-anilid, 2-Iod-benzoesäure-anilid, N-Formyl-N-morpholin-2,2,2-trichlorethylacetal, Piperazin-1,4-diylbis-1-(2,2,2-trichlorethyl)-formamid, 1-(3,4-Dichloranilino)-1-formylamino-2,2,2-trichlorethan;
- Amine wie 2,6-Dimethyl-N-tridecyl-morpholin bzw. dessen Salze, 2,6-Dimethyl-N-cyclododecyl-morpholin bzw. dessen Salze, N-[3-(p-tert.-Butylphenyl)-2-methylpropyl]-cis-2,6-dimethyl-morpholin, N-[3-(p-tert.-Butylphenyl)-2-methylpropyl]-piperidin, (8-(1,1-Dimethylethyl)-N-ethyl-N-propyl-1,4-dioxaspiro[4.5]decan-2-methanamin;
- Azole wie 1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-4-ethyl-1,3-dioxolan-2-yl-ethyl]-1H-1,2,4-triazol, 1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-4-n-propyl-1,3-dioxolan-2-yl-ethyl]-1H-1,2,4-triazol, N-(n-Propyl)-N-(2,4,6-trichlorphenoxyethyl)-N'-imidazol-yl-harnstoff, 1-(4-Chlorphenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanon, 1-(4-Chlorphenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanol, (2RS,3RS)-1-[3-(2-Chlorphenyl)-2-(4-fluorphenyl)-oxiran-2-ylmethyl]-1H-1,2,4-triazol, 1-[2-(2,4-Dichlorphenyl)-pentyl]-1H-1,2,4-triazol, 2,4'-Difluor-

- $\alpha$ -(1H-1,2,4-triazolyl-1-methyl)-benzhydrylalkohol, ,  
 1-((bis-(4-Fluorphenyl)-methylsilyl)-methyl)-1H-1,2,4-triazol,  
 1-[2RS,4RS;2RS,4SR]-4-brom-2-(2,4-dichlorphenyl)tetrahydrofu-  
 5 ryl]-1H-1,2,4-triazol, 2--(4-Chlorphenyl)-3-cyclopro-  
 pyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-butan-2-ol,  
 (+)-4-Chlor-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylme-  
 thyl)-1,3-dioxolan-2-yl]-phenyl-4-chlorphenylether,  
 (E)-(R,S)-1-(2,4-dichlorphenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-tria-  
 10 zol-1-yl)pent-1-en-3-ol, 4-(4-Chlorphenyl)-2-phe-  
 nyl-2-(1H-1,2,4,-triazolylmethyl)-butyronitril, 3-(2,4-dichlor-  
 phenyl)-6-fluor-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)chinazolin-4(3H)-on,  
 (R,S)-2-(2,4-Dichlorphenyl)-1-H-1,2,4-triazol-1-yl)-hex-  
 ano-2-ol, (1RS,5RS;1RS,5SR)-5-(4-chlorbenzyl)-2,2-dime-  
 thyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol,  
 15 (R,S)-1-(4-chlorphenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl-  
 methyl)pentan-3-ol, (+)-2-(2,4,-Dichlorphe-  
 nyl)-3-(1H-1,2,4-triazolyl)-propyl-1,1,2,2-tetrafluorethy-  
 lether, (E)-1-[1-[4-Chlor-2-trifluormethyl)-phe-  
 nyl]-imino)-2-propoxyethyl]-1H-imidazol, 2-(4-Chlorphe-  
 20 nyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-hexannitril,  
 $\alpha$ -(2-Chlorphenyl)- $\alpha$ -(4-chlorphenyl)-5-pyrimidin-methanol, 5-Bu-  
 tyl-2-dimethylamino-4-hydroxy-6-methyl-pyrimidin, Bis-(p-chlor-  
 phenyl)-3-pyridinmethanol, 1,2-Bis-(3-ethoxycarbonyl-2-thiou-  
 reido)-benzol, 1,2-Bis-(3-methoxycarbonyl-2-thioureido)-benzol,  
 25 • Strobilurine wie Methyl-E-methoxyimino-[ $\alpha$ -(o-tolyloxy)-o-to-  
 lyl]acetat, Methyl-E-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)-pyrimi-  
 din-4-yloxy]-phenyl}-3-methoxyacrylat, Methyl-E-methoxyi-  
 mino-[ $\alpha$ -(2-  
 30 phenoxyphenyl)]-acetamid, Methyl-E-methoxyimino-[ $\alpha$ -(2,5-dime-  
 thylphenoxy)-o-tolyl]-acetamid,  
 • Anilinopyrimidine wie N-(4,6-Dimethylpyrimidin-2-yl)-anilin,  
 N-[4-Methyl-6-(1-propinyl)-pyrimidin-2-yl]-anilin,  
 N-[4-Methyl-6-cyclopropyl-pyrimidin-2-yl]-anilin,  
 35 • Phenylpyrrole wie 4-(2,2-Difluor-1,3-benzodioxol-4-yl)-pyr-  
 rol-3-carbonitril,  
 • Zimtsäureamide wie 3-(4-Chlorphenyl)-3-(3,4-dimethoxyphe-  
 nyl)-acrylsäuremorpholid,  
 40 • sowie verschiedene Fungizide, wie Dodecylguanidinacetat, 3-[3-  
 (3,5-Dimethyl-2-oxycyclohexyl)-2-hydroxyethyl]-glutarimid, N-  
 Methyl-, N-ethyl-(4-trifluormethyl,-2-[3',4'-dimethoxyphe-  
 nyl]-benzoesäureamid, Hexachlorbenzol, DL-Methyl-N-(2,6-dime-  
 thyl-phenyl)-N-furoyl(2)-alaninat, DL-N-(2,6-Dimethyl-phe-  
 45 nyl)-N-(2'-methoxyacetyl)-alanin-methyl- ester, N-(2,6-Dime-  
 thylphenyl)-N-chloracetyl-D,L-2-aminobutyrolacton, DL-  
 N-(2,6-Dimethylphenyl)-N-(phenylacetyl)-alaninmethylester,  
 5-Methyl-5-vinyl-3-(3,5-dichlorphenyl)-2,4-dioxo-1,3-oxazoli-

- 5     din, 3-[3,5-Dichlorphenyl(-5-methyl-5-methoxymethyl)-1,3-oxazolidin-2,4-dion, 3-(3,5-Dichlorphenyl)-1-isopropylcarbamoylethandantoin, N-(3,5-Dichlorphenyl)-1,2-dimethylcyclopropan-1,2-dicarbonssäureimid, 2-Cyano-[N-(ethylaminocarbonyl)-2-methoximino]-acetamid, N-(3-Chlor-2,6-dinitro-4-trifluormethylphenyl)-5-trifluormethyl-3-chlor-2-aminopyridin

- 10    Funktionell äquivalente Derivate dieser Fungizide besitzen ein vergleichbares Wirkungsspektrum gegen phytopathogene Pilze wie die konkret genannten Substanzen, bei niedrigerer, gleicher oder höherer phytotoxischer Aktivität.
- 15    Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Allgemeine Klonierungsverfahren

- 20    Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von
- 25    Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

- 30    Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777). Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere
- 35    geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984) 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230)
- 40    benutzt.

#### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 45    Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Pharmacia nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA

74 (1977), 5463-5467).

#### Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

- 5 In das Plasmid pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12, 8711 (1984)) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment (entsprechend den Nukleotiden 6909-7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. Cell 21 (1980) 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5  
10 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835), Nukleotide 11749-11939 wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert. Es entstand das Plasmid pBi-  
15 nAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221-230).

#### Anwendungsbeispiele

##### Beispiel 1

- 20 Da Fungizide nicht immunogen sind, müssen sie an ein Trägermaterial wie z.B. KLH gekoppelt werden. Befindet sich eine reaktive Gruppe im Molekül, kann diese Kopplung direkt erfolgen, ansonsten wird während der Synthese des Fungizides eine funktionelle Gruppe eingeführt oder eine reaktive Vorstufe während der  
25 Synthese ausgesucht, um diese Moleküle in einem einfachen Reaktionsschritt an das Trägermolekül zu koppeln. Beispiele für Kopplungen sind bei Miroslavic Ferencik in "Handbook of Immunochemistry", 1993, Chapman & Hall, im Kapitel Antigene, Seite 20 -  
30 49 beschrieben.

- Durch wiederholte Injektion dieses modifizierten Trägermoleküls (Antigens) werden z.B. Balb/c-Mäuse immunisiert. Sobald im Serum  
35 genügend Antikörper mit Bindung an das Antigen im ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) nachweisbar sind, werden die Milzzellen dieser Tiere entnommen und mit Myelomzellen fusioniert um Hybride zu kultivieren. Im ELISA wird zusätzlich als Antigen "Fungizid-modifiziertes BSA" verwendet, um die gegen das Hapten gerichtete Immunantwort von der KLH-Antwort zu unterscheiden.  
40

- Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgt in Anlehnung an bekannte Methoden, wie z.B. beschrieben in "Practical Immunology", Leslie Hudson und Frank Hay, Blackwell Scientific  
45 Publications, 1989 oder in "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", James Goding, 1983, Academic Press, Inc., oder in "A practical guide to monoclonal antibodies", J.Liddell und A.

Cryer, 1991, John Wiley & Sons; oder Achim Möller und Franz Emling "Monoklonale Antikörper gegen TNF und deren Verwendung". Europäische Patentschrift EP-A260610.

## 5 Beispiel 2

Ausgangspunkt der Untersuchung war ein monoklonaler Antikörper der spezifisch das Fungizid BAS 490F erkennt und der außerdem eine hohe Bindungsaffinität aufweist. Die selektionierte Hybridomazelllinie ist dadurch charakterisiert, daß die sekretierten, gegen das Fungizid-Antigen BAS 490F gerichteten monoklonalen Antikörper eine hohe Affinität aufweisen und die spezifischen Sequenzen der Immunglobuline verfügbar sind (Berek, C. et al., Nature 316, 412-418, 1985). Dieser monoklonale Antikörper gegen BAS 490F war Ausgangspunkt für die Konstruktion des Einketten-Antikörperfragmentes (scFv-antiBAS 490F).

Zunächst wurde mRNA aus den Hybridomzellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für die Amplifikation der variablen Immunglobulingene VH und VK mit den spezifischen Primern VH1 BACK und VH FOR-2 für die schwere Kette sowie VK2 BACK und MJK5 FON X für die leichte Kette (Clackson et al., Nature 352, 624-628, 1991). Die isolierten variablen Immunglobuline waren Ausgangspunkt für die Konstruktion eines Einketten-Antikörperfragmentes (scFv-antiBAS 490F). Bei der nachfolgenden Fusions-PCR wurden drei Komponenten VH, VK und ein Linkerfragment in einem PCR-Reaktionsansatz vereinigt und das scFv-antiBAS 490F amplifiziert (Abb. 3 ).

Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) des konstruierten scFv-antiBAS 490F-Gens erfolgte nach Expression in einem bakteriellen System. Das scFv-antiBAS 490F wurde dazu nach der Methode von Hoogenboom, H.R. et al., Nucleic Acids Research 19, 4133-4137, 1991 als lösliches Antikörperfragment in E.coli synthetisiert. Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurden in ELISA-Tests überprüft (Abb.4 ).

Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-antiBAS 490F Gen stromabwärts vom LeB4-Promotor kloniert. Der aus Vicia faba isolierte LeB4-Promotor zeigt eine streng samenspezifische Expression von verschiedenen Fremdgenen in Tabak (Bäumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. 225, 121-128, 1991). Durch Transport des scFv-antiBAS 490F Polypeptides in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-

antiBAS 490F Gen wurde zu diesem Zweck mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., 1992), fusioniert (Abb. 5 ).

5

Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSGLuc 1 (Saito et al., 1990) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobakterienklone wurden für die nachfolgende Transformation von *Nicotiana tabacum* verwendet. Pro Konstrukt wurden 70-140 Tabakpflanzen regeneriert. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen zeigt, daß durch die Fusion des scFv-antiBAS 490F Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL eine maximale Akkumulation von 1,9 % scFv-antiBAS 490F Protein im reifen Samen erzielt werden konnte.

20

Das konstruierte scFv-antiBAS 490F Gen hatte eine Größe von ca. 735 bp. Die variablen Domänen wurden in der Reihenfolge VH-L-VL miteinander fusioniert.

25

Die spezifische Selektivität wurde in den Extrakten der reifen Tabaksamen mit einem direkten ELISA bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte zeigen deutlich, daß die Proteinextrakte funktionell aktive Antikörperfragmente enthalten.

30 Beispiel 3

Samenspezifische Expression und Anreicherung von Einketten-Antikörperfragmenten im endoplasmatischen Retikulum von Zellen transgener Tabaksamen kontrolliert durch den USP- Promotor.

35

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein Einzelketten-Antikörperfragment gegen das Fungizid BAS 490F (scFv-anti BAS 490F). Die funktionelle Charakterisierung (Antigenbindungsaktivität) dieses konstruierten scFv-anti- BAS 490F Genes erfolgte nach Expression in einem bakteriellen System und nach Expression in Tabakblättern. Die Aktivität und die Spezifität des konstruierten Antikörperfragmentes wurde in ELISA-Tests überprüft.

45

Um eine samenspezifische Expression des Antikörperfragmentes in Tabak zu ermöglichen, wurde das scFv-antiBAS 490F Gen stromabwärts vom USP-Promotor kloniert. Der aus *Vicia faba* isolierte

USP-Promotor zeigt eine streng samenspezifische Expression von verschiedenenene Fremdgenen in Tabak (Fiedler, H. et al., Plant Mol. Biol. 22, 669-679, 1993). Durch Transport des scFv-antiBAS 490F Polypeptides in das endoplasmatische Retikulum wurde eine  
5 stabile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen erreicht. Das scFv-antiBAS 490F Gen wurden zu diesem Zweck mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal SEKDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., 1992), fusioniert (Abb. 1 ).

10

Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSGLUC1 (Saito et al., 1990) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium-Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobaktrienklone wurden für die nachfolgende Transformation von  
15 Nicotiana tabacum verwendet. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurden nach Selbstbefruchtung Samen verschiedener Entwicklungsstadien geerntet. Von diesen Samen wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Die Analyse der transgenen Pflanzen zeigt, daß durch die  
20 Fusion des scFv-antiBAS 490F Gens mit der DNA-Sequenz des ER-Retentionssignals SEKDEL unter Kontrolle des USP-Promotors bereits ab Tag 10 der Samenentwicklung Einketten-Antikörperfragmente mit Bindeaffinität für BAS 490F synthetisiert wurden.

25

#### Beispiel 4

Um eine ubiquitäre Expression des Antikörperfragmentes in der Pflanze, speziell in Blättern, zu erreichen, wurde das scFv-anti-  
30 BAS 490F -Gen stromabwärts vom CaMV 35 S-Promotor kloniert. Dieser starke konstitutive Promotor vermittelt eine Expression von Fremdgenen in nahezu allen pflanzlichen Geweben (Benfey und Chua, Science 250 (1990), 956 - 966). Durch Transport des scFv-antiBAS 490F Proteins in das endoplasmatische Retikulum wurde eine sta-  
35 bile Akkumulation hoher Antikörperfragmentmengen im Blattmaterial erreicht. Das scFv-antiBAS 490F Gen wurde zunächst mit einer Signalpeptidsequenz, die den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum und dem ER-Retentionssignal KDEL, das ein Verbleiben im ER gewährleistet (Wandelt et al., Plant J. 2(1992), 181 - 192) fu-  
40 sioniert. Die konstruierte Expressionskassette wurde in den binären Vektor pGSGLUC 1 (Saito et al., Plant Cell Rep. 8(1990), 718 - 721) kloniert und durch Elektroporation in den Agrobakterium - Stamm EHA 101 transferiert. Rekombinante Agrobakterienklone wurden für die nachfolgende Transformation von Nicotiana tabacum  
45 verwendet. Es wurden ungefähr 100 Tabakpflanzen regeneriert. Von den regenerierten transgenen Tabakpflanzen wurde Blattmaterial verschiedenener Entwicklungsstufen entnommen. Von diesem Blattma-

terial wurden die löslichen Proteine nach Extraktion in einem wässrigen Puffersystem erhalten. Nachfolgende Analysen (Western-Blot-Analysen und ELISA-Tests) zeigten, daß in den Blättern eine maximale Akkumulation von größer 2 % an biologisch aktivem, anti-  
5 genbindendem scFv-antiBAS 490F Polypeptid erzielt werden konnte. Die hohen Expressionswerte wurden in ausgewachsenen grünen Blättern ermittelt, aber auch in seneszentem Blattmaterial konnte das Antikörperfragment nachgewiesen werden.

#### 10 Beispiel 5

PCR-Amplifikation eines Fragmentes der cDNA codierend für den Ein-Ketten-Antikörper gegen BAS 490F mithilfe synthetischer  
15 Oligonukleotide.

15

Die PCR-Amplifikation der Ein-Ketten-Antikörper cDNA wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Die Reaktionsgemische enthielten 8 ng/ $\mu$ l einzelsträngige Matrizen-  
20 cDNA , 0,5  $\mu$ M der entsprechenden Oligonukleotide,  
200  $\mu$ M Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>) und 0.02 U/ $\mu$ l Taq Polymerase (Perkin Elmer). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

25 Anlagerungstemperatur:	45°C
Denaturierungstemperatur:	94°C,
Elongationstemperatur:	72°C,
Anzahl der Zyklen:	40

30 Es resultierte ein Fragment von ca. 735 Basenpaaren, das in den Vektor pBluescript ligiert wurde. Mit dem Ligationsansatz wurde E. coli XL-I Blue transformiert und das Plasmid amplifiziert. Zur Anwendung und Optimierung der Polymerase Kettenreaktion siehe:  
Innis et al., 1990, PCR Protocols, a Guide to Methods and Ap-  
35 plications, Academic Press.

#### Beispiel 6

40 Herstellung transgener Tabakpflanzen, die eine cDNA codierend für einen Ein-Ketten-Antikörper mit Fungizid-bindenden Eigenschaften exprimieren.

Das Plasmid pGSGLuc 1 wurde in Agrobacterium tumefaciens  
45 C58C1:pGV2260 transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen (Nicotiana tabacum cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakte-



- rienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Physiol. Plant. 15 (1962) 473 ff.) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten
- 5 inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthyllessigsäure und 1,6 g/l Glukose
- 10 weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

#### Beispiel 7

15

Stabile Akkumulation des Einketten-Antikörperfragmentes gegen das Fungizid BAS 490F im endoplasmatischen Reticulum.

- 20 Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein in Tabakpflanzen exprimiertes Einketten-Antikörperfragment gegen das Fungizid BAS 490F(scFv-anti BAS 490F). Menge und Aktivität des synthetisierten scFv-antiBAS 490F Polypeptides wurden in Western-Blot-Analysen und ELISA-Tests bestimmt.

25

- Um eine Expression des scFv-antiBAS 490F-Gens im endoplasmatischen Retikulum zu ermöglichen, wurde das Fremdgen unter der Kontrolle des CaMV 53S-Promotors als eine Translationsfusion mit dem LeB4-Signalpeptid (N-terminal) und dem ER-Retentionssignal
- 30 KDEL (C-terminal) exprimiert. Durch Transport des scFv-antiBAS 490F Polypeptides in das endoplasmatische Retikulum wurde eine stabile Akkumulation hoher Mengen an aktivem Antikörperfragment erreicht. Nach Ernte des Blattmaterials wurden Stücke bei -20°C eingefroren (1), lyophilisiert (2) oder bei Raumtemperatur ge-
- 35 trocknet (3). Die löslichen Proteine wurden aus dem jeweiligen Blattmaterial durch Extraktion in einem wässrigen Puffer erhalten und das scFv-antiBAS 490F Polypeptid affinitätschromatographisch gereinigt. Gleiche Mengen an gereinigtem scFv-antiBAS 490F Polypeptids (eingefroren, lyophilisiert und getrocknet) wurden für
- 40 die Bestimmung der Aktivität des Antikörperfragmentes eingesetzt (Abb. 6). In Abb. 6 A ist die Antigenbindungsaktivität des aus frischen (1), lyophilisierten (2) und getrockneten Blättern (3) gereinigten scFv-antiBAS 490F Polypeptides dargestellt. In Abb. 6 B sind die jeweiligen Mengen an scFv-antiBAS 490F Protein
- 45 (etwa 100 ng), die für die ELISA-Analysen eingesetzt wurden, mittels Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Größen der Proteinmolekulargewichtsstandards sind links dargestellt. Dabei wurden

etwa gleiche Antigenbindungsaktivitäten festgestellt.

#### Beispiel 8

- 5 Zum Nachweis der Fungizid-Toleranz der ein Polypeptid mit Fungizid-bindenden Eigenschaften produzierenden transgenen Tabakpflanzen wurden diese mit unterschiedlichen Mengen BAS 490F behandelt. In allen Fällen konnte im Gewächshaus gezeigt werden, daß die ein
- 10 scFv-antiBAS 490F Gen exprimierenden Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Toleranz gegenüber dem Fungizid BAS 490F und geringere phytotoxische Wirkungen zeigen.

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Fungizid-toleranten Pflanzen  
5 durch Expression eines exogenen Fungizid-bindenden Polypeptids in den Pflanzen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es  
10 sich bei dem exogenen Fungizid-bindenden Polypeptid um ein Einketten-Antikörperfragment handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es  
15 sich bei dem exogenen Fungizid-bindenden Polypeptid um einen kompletten Antikörper oder um ein davon abgeleitetes Fragment handelt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es  
20 sich bei dem Fungizid um methyl methoxyimino- $\alpha$ -(o-tolyloxy)-o-tolylacetate ( BAS 490F ) handelt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mono- oder dikotyle Pflanzen handelt.
- 25 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Pflanze um Tabak handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids konstitutiv in der Pflanze erfolgt.  
30
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids in der Pflanze induziert wird.  
35
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids in den Blättern der Pflanze erfolgt.
- 40 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression des exogenen Polypeptids in den Samen der Pflanze erfolgt.

Zeichn.

## 26

11. Expressionskassette für Pflanzen bestehend aus einem Promotor, einem Signalpeptid, einem Gen codierend für die Expression eines exogenen Fungizid-bindenden Polypeptids, einem ER-Retentionssignal und einem Terminator.
- 5
12. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als konstitutiver Promotor der CaMV 35S-Promotor verwendet wird.
- 10 13. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen eines Einketten-Antikörperfragmentes eingesetzt wird.
14. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als zu exprimierendes Gen das Gen oder Genfragment eines Fungizid-bindenden Polypeptides als Translationsfusion mit anderen funktionellen Proteinen wie zum Beispiel Enzymen, Toxinen, Chromophoren und Bindeproteinen eingesetzt wird.
- 15
- 20 15. Expressionskassette nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das zu exprimierende Polypeptidgen aus einer Hybridomazelle oder mit Hilfe anderer rekombinanter Methoden - wie z.B. der Antikörper-Phage-Display Methode - gewonnen wird.
- 25 16. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 11 zur Transformation von dicotylen oder monokotylen Pflanzen, die konstitutiv samen- oder blatt-spezifisch ein exogenes Fungizid-bindendes Polypeptid exprimieren.
- 30 17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expressionskassette in einen Bakterienstamm transferiert und die entstandenen rekombinanten Klone zur Transformation von dicotylen oder monokotylen Pflanzen, die konstitutiv samen- oder blattspezifisch ein exogenes Fungizid-bindendes Polypeptid exprimieren, verwendet.
- 35
18. Verwendung der Expressionskassette nach Anspruch 11 als Selektionsmarker.
- 40 19. Verwendung einer transformierten Pflanze wie nach Anspruch 17 oder 18 erhalten zur Herstellung eines Fungizid-bindenden Polypeptids.

20. Verfahren zur Transformation einer Pflanze durch Einbringen einer Gensequenz, die für ein Fungizid-bindendes Polypeptid codiert, in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze und Protoplasten von Pflanzenzellen.
- 5
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe eines Agrobacteriums insbesondere der Art *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt.
- 10
22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der Elektroporation erfolgt.
23. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der particle bombardment Methode erfolgt.
- 15
24. Herstellung eines Fungizid-bindenden Polypeptides durch Expression eines Gens codierend für ein derartiges Polypeptid in einer Pflanze bzw. Zellen einer Pflanze und anschließende Isolierung des Polypeptides.
- 20
25. Pflanze enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Expressionskassette Toleranz gegenüber einem Fungizid vermittelt.
- 25
26. Pflanze nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie tolerant gegenüber methyl methoxyimino- $\alpha$ -(o-tolyloxy)-o-tolyacetate ( BAS 490F ) ist.
- 30
27. Verfahren zur Bekämpfung von phytopathogenen Pilzen in transgenen Fungizid-toleranten Kulturpflanzen dadurch gekennzeichnet, daß Fungizide eingesetzt werden, gegen die die Kulturpflanze Fungizid-bindende Polypeptide oder Antikörper bildet.
- 35
28. Fungizid-bindende Polypeptide bzw. Antikörper mit hoher Bindeaffinität zu methyl methoxyimino- $\alpha$ -(o-tolyloxy)-o-tolyacetate ( BAS 490F ), dadurch gekennzeichnet, daß sie gemäß Anspruch 24 hergestellt werden.
- 40

Expression von Fungizid-bindenden Polypeptiden in Pflanzen zur  
Erzeugung von Fungizidtoleranz

5 Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Fungizid-toleranten Pflanzen durch  
Expression eines Fungizid-bindenden Antikörpers in den Pflanzen.

10

15

20

25

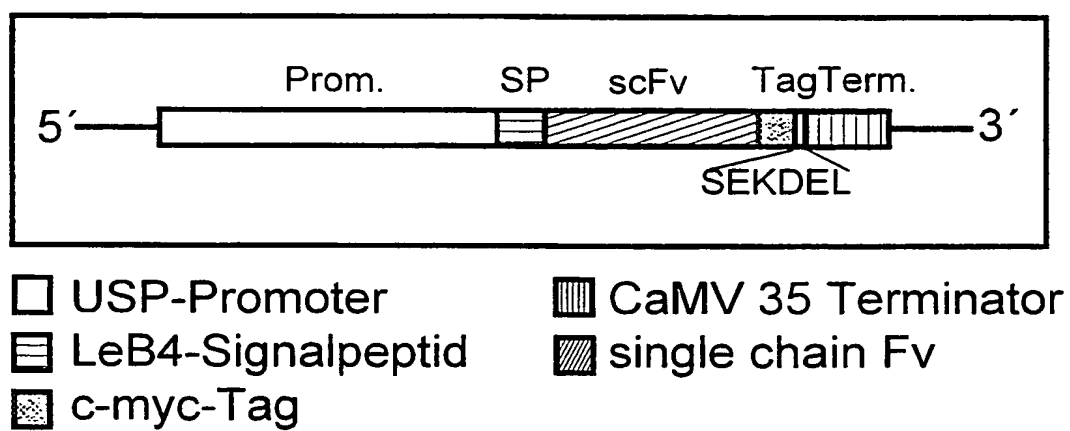
30

35

40

45

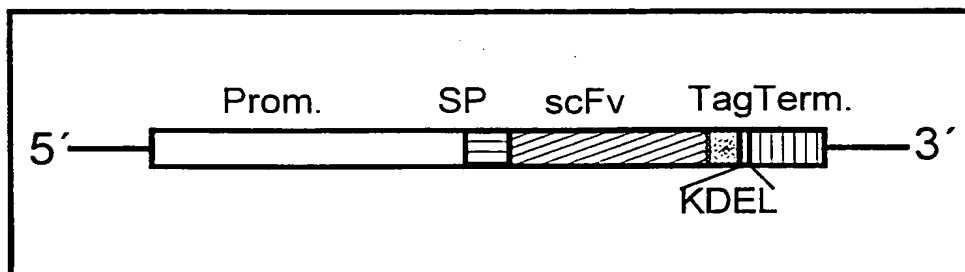
Fig. 1



This Page Blank (uspto)



fig. 2

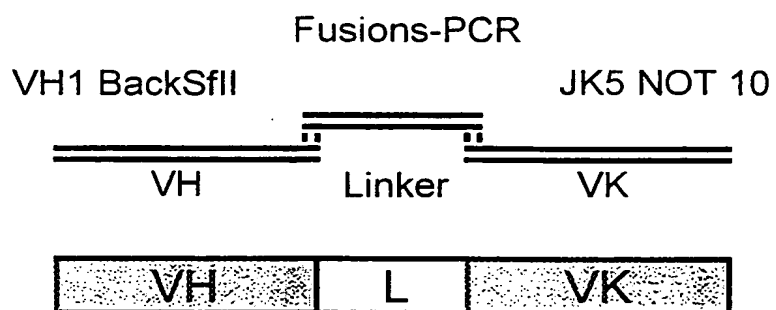


- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> CaMV 353 Promoter | <input type="checkbox"/> CaMV 35 Terminator |
| <input type="checkbox"/> LeB4-Signalpeptid | <input type="checkbox"/> single chain Fv    |
| <input type="checkbox"/> c-myc-Tag         |   |

This Page Blank (uspto)

3/6

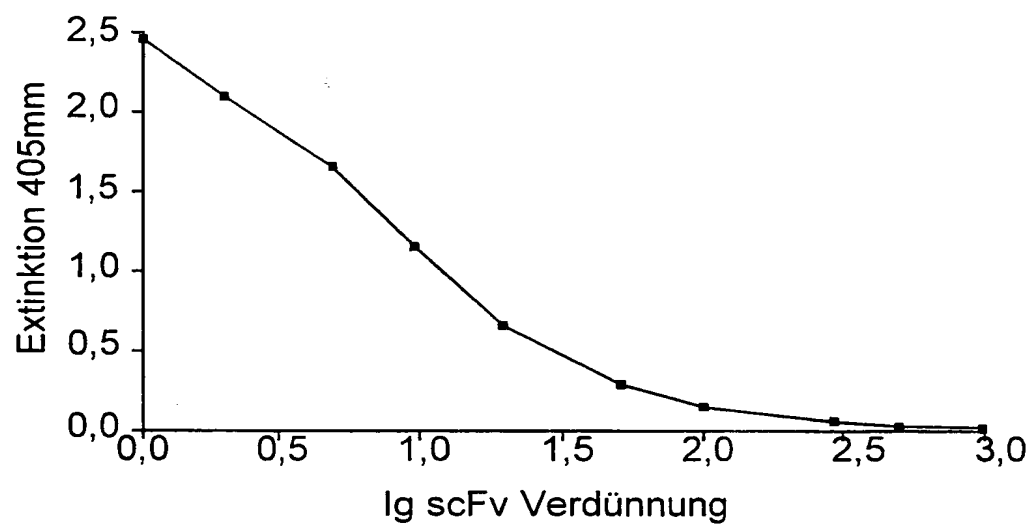
Fig. 3



**This Page Blank (uspto)**

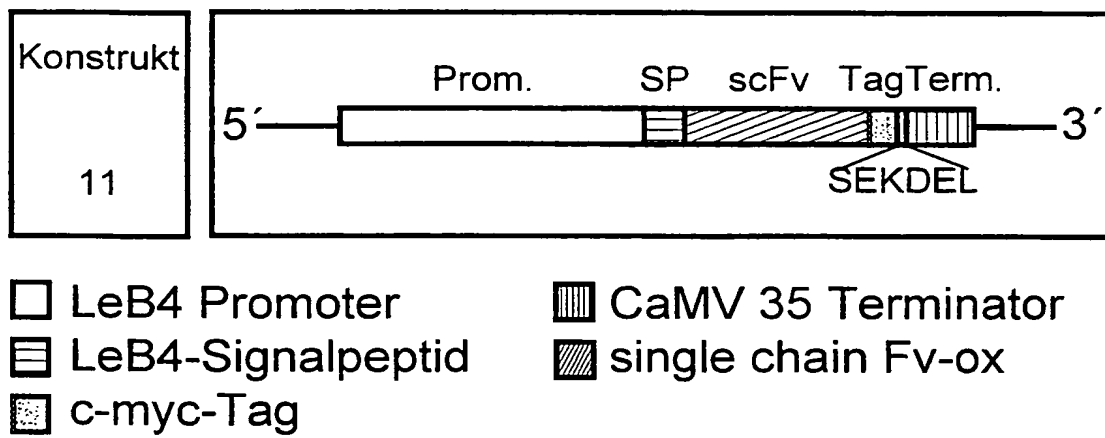
4/6

Fig. 4



*This Page Blank (uspto)*

Fig. 5

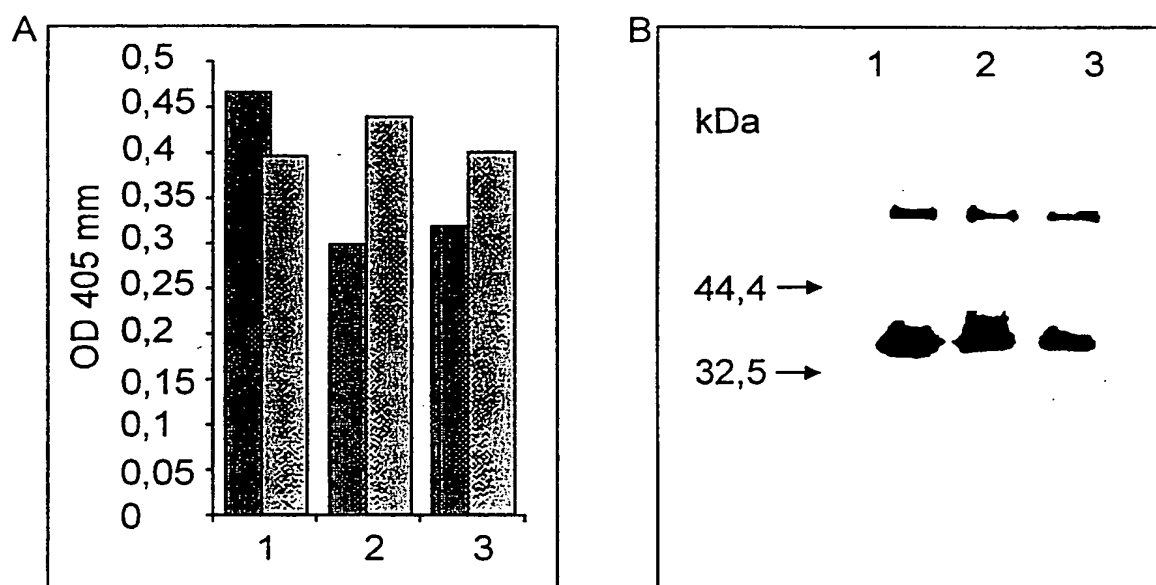


*This Page Blank (uspto)*



6/6

Fig. 6



This Page Blank (uspto)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/EP 98/02242

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C07K16/44 C12N15/13 A01H5/00 A01N63/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A01H A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SWAIN W F: "ANTIBODIES IN PLANTS" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 9, no. 4, 1 April 1991, pages 107-109, XP000207981 Page 107, last paragraph, page 108, Left hand column	1,3,5,7, 9,20-24, 27
Y	HIATT A ET AL: "ASSEMBLY OF MULTIMERIC PROTEINS IN PLANT CELLS: CHARACTERISTICS AND USES OF PLANT-DERIVED ANTIBODIES" BOOKS IN SOILS PLANTS AND THE ENVIRONMENT: TRANSGENIC PLANTS: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS, 1 January 1993, pages 221-237, XP000569962 Page 230, lines 12-24  -/--	1,3,5,7, 9,20-24, 27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 1998

Date of mailing of the international search report

25/08/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/02242

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 520 962 A (ENEA ENTE NUOVE TEC ;CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE (IT)) 30 December 1992 Column 1, lines 21-36; Column 3, line 55 - Column 4, line 2; Abstract, Claim 15	1,3,5,7, 9,20-24, 27
Y	WO 94 23018 A (ISK BIOTECH CORP) 13 October 1994 Pages 1, 2, 4, 8, 9; Page 19, Lines 25-36; page 29; Example 11; Claims	1,3,5,7, 9,20-24, 27
A	FIEDLER, U. AND CONRAD, U.: "High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds" BIOTECHNOLOGY, vol. 13, October 1995, pages 1090-1093, XP002074416 cited in the application Abstract, page 1090, right hand column	1-28
A	ARTSAENKO, O., ET AL. : "expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco" THE PLANT JOURNAL, vol. 8, no. 5, 1995, pages 745-750, XP002074417 cited in the application Page 745; Figure 1	1-28
A	SCHOUTEN A ET AL: "THE C-TERMINAL KDEL SEQUENCE INCREASES THE EXPRESSION LEVEL OF A SINGLE-CHAIN ANTIBODY DESIGNED TO BE TARGETED TO BOTH THE CYTOSOL AND THE SECRETORY PATHWAY IN TRANSGENIC TOBACCO" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 30, 1996, pages 781-793, XP000677225 cited in the application	1-28

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/EP 98/02242

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0520962	A	30-12-1992	IT	1248361 B	05-01-1995
WO 9423018	A	13-10-1994	AU	6417494 A	24-10-1994
			US	5654178 A	05-08-1997

**THIS PAGE IS BLANK**

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C07K16/44 C12N15/13 A01H5/00 A01N63/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K A01H A01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr.

Y SWAIN W F: "ANTIBODIES IN PLANTS" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 9, Nr. 4, 1. April 1991, Seiten 107-109, XP000207981 Seite 107, letzter Absatz, Seite 108, linke Spalte 1,3,5,7, 9,20-24, 27

Y HIATT A ET AL: "ASSEMBLY OF MULTIMERIC PROTEINS IN PLANT CELLS: CHARACTERISTICS AND USES OF PLANT-DERIVED ANTIBODIES" BOOKS IN SOILS PLANTS AND THE ENVIRONMENT: TRANSGENIC PLANTS: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS, 1. Januar 1993, Seiten 221-237, XP000569962 Seite 230, Zeile 12-34 1,3,5,7, 9,20-24, 27

-/-

X Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

X Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. August 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/08/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 520 962 A (ENEA ENTE NUOVE TEC ;CONSIGLIO NAZIONALE RICERCHE (IT)) 30. Dezember 1992 Spalte 1, Zeile 21-36; Spalte 3, Zeile 55 - Spalte 4, Zeile 2; Zusammenfassung, Anspruch 15 ---	1,3,5,7, 9,20-24, 27
Y	WO 94 23018 A (ISK BIOTECH CORP) 13. Oktober 1994  Seite 1,2,4,8,9; Seite 19, Zeile 25-36; Seite 29; Beispiel 11; Ansprüche ---	1,3,5,7, 9,20-24, 27
A	FIEDLER, U. AND CONRAD, U.: "High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds" BIOTECHNOLOGY, Bd. 13, Oktober 1995, Seiten 1090-1093, XP002074416 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung, Seite 1090, rechte Spalte ---	1-28
A	ARTSAENKO, O., ET AL. : "expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco" THE PLANT JOURNAL , Bd. 8, Nr. 5, 1995, Seiten 745-750, XP002074417 in der Anmeldung erwähnt Seite 745; Abb. 1 ---	1-28
A	SCHOUTEN A ET AL: "THE C-TERMINAL KDEL SEQUENCE INCREASES THE EXPRESSION LEVEL OF A SINGLE-CHAIN ANTIBODY DESIGNED TO BE TARGETED TO BOTH THE CYTOSOL AND THE SECRETORY PATHWAY IN TRANSGENIC TOBACCO" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 30, 1996, Seiten 781-793, XP000677225 in der Anmeldung erwähnt -----	1-28



# INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/02242

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0520962	A	30-12-1992	IT	1248361 B	05-01-1995
WO 9423018	A	13-10-1994	AU	6417494 A	24-10-1994
			US	5654178 A	05-08-1997

this page blank (uspto)